

Aus der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie
(II. Physiologische Abteilung) des W. G. Kerckhoff-Instituts
der Max Planck-Gesellschaft in Bad Nauheim
(Direktor: Professor Dr. med. E. Dodt)

Der Einfluß der Temperatur auf die langsamen Reaktionsschritte der Sehpurpurbleichung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von

Reinhard Reinheimer
aus Nieder - Ramstadt

Bad Nauheim 1972

Aus der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie
(II. Physiologische Abteilung) des W. G. Kerckhoff-Instituts
der Max Planck-Gesellschaft in Bad Nauheim
(Direktor: Professor Dr. med. E. Dodt)

Der Einfluß der Temperatur auf die langsamen Reaktionsschritte der Sehpurpurbleichung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von

Reinhard Reinheimer

aus Nieder - Ramstadt

Bad Nauheim 1972



Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Hj. Staudinger
Referent:	Prof. Dr. med. Ch. Baumann
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. L. Lumper

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodik	4
1. Präparation	4
2. Perfusion	4
3. Temperatur	4
4. Spektrophotometrie	4
5. Bleichung	5
6. Computer-Auswertung	6
III. Ergebnisse	7
1. Spektren der isolierten Netzhaut vor und nach Bleichung	7
2. Einfluß der spektralen Zusammensetzung des Blitzlichtes auf die Anfangsbedingungen der langsamen Dunkelreaktionen	9
3. Die Kinetik der langsamen Dunkelreaktionen	12
a. Bestimmung von k_1 , k_2 und k_3	15
b. Bestimmung von k_4	19
IV. Diskussion	23
1. Untersuchter Temperaturbereich	23
2. Gültigkeit des reaktionskinetischen Modells	23
3. Einfluß der Temperatur auf die Geschwindig- keitskonstanten k_1 , k_2 und k_3	26
4. Die Geschwindigkeitskonstante k_4	28
V. Zusammenfassung	31
Literaturverzeichnis	33
Dank	36
Lebenslauf	37

I. Einleitung

Als Sehpurpurbleichung bezeichnet man den durch Licht ausgelösten Zerfall des in den Außengliedern der retinalen Stäbchen vorkommenden Pigmentes Sehpurpur. International gebräuchlicher als der von KÜHNE (1878) eingeführte Name Sehpurpur ist die Bezeichnung Rhodopsin, die gleichfalls auf KÜHNE zurückgeht. Die erste Beschreibung der Sehpurpurbleichung, bei der die Netzhaut ihre rötliche Farbe verliert, stammt von BOLL (1876).

Nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens besteht das Rhodopsin-Molekül aus Opsin, einem nicht näher bekannten Protein vom Molekulargewicht 40 000, und 11-cis-Retinal (Vitamin A₁-Aldehyd) als prosthetischer Gruppe und Chromophor. Die beiden Anteile sind als Schiff'sche Base aneinander gebunden (BALL, COLLINS, DALVI und MCRTON, 1949); zusätzliche Bindungen werden postuliert (DARTNALL und LYTHGOE, 1965).

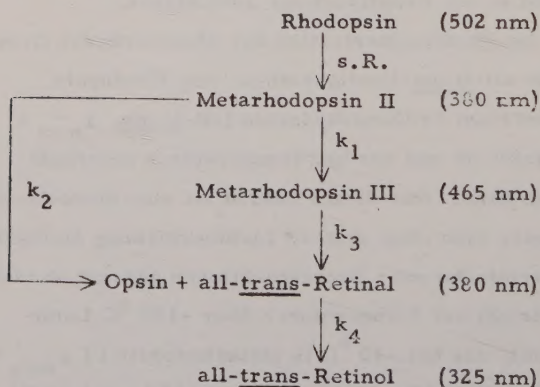
Die Absorption eines Lichtquants durch ein Rhodopsin-Molekül leitet den Ablauf einer Reaktionsfolge ein. Mit in-vitro-Methoden, d.h. nach Extraktion des Rhodopsins aus den Rezeptorzellen mit Detergenzien, ist versucht worden, die Photoprodukte des Rhodopsins anhand ihrer Absorptionseigenschaften in der zeitlichen Reihenfolge ihres Auftretens nach Belichtung zu erfassen und so die Reaktionsfolge aufzuklären.

Der erste Schritt ist die Photoisomerisation der chromophoren Gruppe von der 11-cis- in die all-trans-Konfiguration. Aus Rhodopsin (11-cis, $\lambda_{\max} = 502 \text{ nm}$) entsteht Prälumirhodopsin (all-trans, $\lambda_{\max} = 543 \text{ nm}$), das äußerst instabil ist und nur bei Temperaturen unterhalb -140°C untersucht werden kann. Nur dieser Schritt ist eine photochemische Reaktion. Es schließen sich ohne weitere Lichteinwirkung Molekülveränderungen an, die thermische oder Dunkelreaktionen genannt werden. Aus Prälumirhodopsin entsteht bei Temperaturen über -140°C Lumirhodopsin ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$), das bei -40°C in Metarhodopsin I ($\lambda_{\max} = 478 \text{ nm}$) übergeht. Nach MATTHEWS, HUBBARD, BROWN und WALD (1963) steht Metarhodopsin I mit Metarhodopsin II ($\lambda_{\max} = 380 \text{ nm}$) in einem tautomeren Gleichgewicht, das sich mit steigender Temperatur

mehr und mehr auf die Seite von Metarhodopsin II verschiebt. Alle diese Reaktionen verlaufen im physiologischen Temperaturbereich um Größenordnungen schneller als die sich anschließenden langsamen Dunkelreaktionen, die zur Bildung der stabilen Endprodukte all-trans-Retinol und Opsin führen.

Über das Schema der langsamen Dunkelreaktionen bestehen unterschiedliche Ansichten. MATTHEWS et al. (1963) nehmen eine Hydrolyse von Metarhodopsin II (später hier nur noch Meta II genannt) in Retinal und Opsin an, während nach OSTROY, ERHARDT und ABRAHAMSON (1966) Meta II über die Zwischenstufen Metarhodopsin III (synonym 465-compound oder Pararhodopsin, später hier nur noch Meta III genannt) und N-Retinyliden-Opsin (NRO) in Retinal und Opsin zerfällt.

Die bisher zitierten Befunde sind ausschließlich an micellkolloidalen Lösungen des Rhodopsins, also am extrahierten Pigment, erhoben worden. Welche Reaktionswege in intakten Photorezeptoren beschriftet werden, ist erst neuerdings aufgeklärt worden. Für die langsamen Dunkelreaktionen in der Froschretina gilt z.B. keine der zitierten Auffassungen, sondern es existieren zwei parallele Zerfallswege für Meta II (BAUMANN, 1972), die das nachstehende Reaktionsschema erläutert: einmal der Weg über Meta III, zum anderen die direkte Hydrolyse zu Retinal und Opsin.



Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Lage der Absorptionsmaxima. s.R. steht für "schnelle Reaktionsschritte". Das sind die der Bildung

von Meta II vorausgehenden Reaktionen, die innerhalb weniger Millisekunden ablaufen. k_1 bis k_4 sind Geschwindigkeitskonstanten, deren numerische Werte für 21 °C bekannt sind,

Aufgabe dieser Arbeit war es, in der isolierten Froschnetzhaut die Temperaturabhängigkeit der beteiligten Reaktionen und damit die Brauchbarkeit des Reaktionsschemas in einem weiteren Temperaturbereich zu untersuchen. Aus den zu berechnenden Aktivierungsentropien waren Aufschlüsse über Änderungen der Molekülstruktur des Rhodopsins während der Bleichung zu erwarten. Ein Vergleich mit den Ergebnissen entsprechender Untersuchungen an micellkolloidalen Rhodopsinlösungen sollte angestellt werden.

II. Methodik

1. Präparation

Die Versuche wurden an Netzhäuten der Froschspecies Rana esculenta durchgeführt. Die Netzhäute wurden nach mindestens 10 Stunden Dunkel-adaptation bei Rotlicht aus den äquatorial eröffneten Bulbi isoliert.

2. Perfusion

Während des Versuches wurde die Netzhaut von einem Platin-Draht-netz (Draht- ϕ 0,06 mm, Maschenweite 0,25 mm) getragen und in einer Plexiglas-Kammer perfundiert. Die Perfusionslösung enthielt (in mMol/l): NaCl 95; KCL 2; CaCl_2 0,9; MgCl_2 0,5; Glucose 13; Phosphat-Puffer 12 (SICKEL, 1961). Der pH der Lösung lag bei Zimmertemperatur bei Werten zwischen 7,32 und 7,38. Durch Kühlung oder Wärmung des Per-fusats um etwa 10 °C verschoben sich diese Werte um höchstens $\pm$ 0,04 Einheiten. Unter diesen Bedingungen waren pH-Verschiebungen in der Rezeptorzelle nicht zu erwarten (CALDWELL, 1968; KOSTYUK, COROKINA und KHOLODOVA, 1969). Der Kammerdurchfluß wurde auf Werte zwischen 5 und 7 ml/min eingestellt und über den hydrostatischen Druck im Per-fusionssystem konstant gehalten.

3. Temperatur

Die Lösung und somit auch die Netzhaut wurden mit Hilfe eines Thermostaten und eines Wärmeaustauschers nach Art eines Liebig-Kühlers temperiert. Es konnte während jedes Versuches eine Tempera-turkonstanz von $\pm$ 0,2 °C eingehalten werden, die durch ein in die Kam-mer eingebautes Thermoelement überprüft wurde. Ein Kühlluftgebläse verhinderte die bei tieferen Temperaturen störende Kondensation auf der Kammeroberfläche.

4. Spektrophotometrie

Monochromatisches Licht lieferte ein Geradsicht-Spiegelmonochro-mator (Leitz) mit einer Halogen-Lampe (12 V, 100 W, Philips), die von einer Konstantstromquelle (12 V, $I_{\text{max}} = 8 \text{ A}$) gespeist wurde. Zwischen

Lampe und Monochromator befand sich ein Wärmeschutzfilter (KG 1), bei Arbeiten im u.v.-Bereich zusätzlich ein Falschlichtfilter (UG 11). Die spektrale Bandbreite (Halbwertsbreite) betrug zwischen 0,8 und 2,5 nm. Die im Strahlengang liegenden Teile der Perfusionskammer bestanden aus Quarz. Ausgeleuchtet wurde ein 12 mm² großes Netzhaut-Areal. Referenzwerte wurden gewonnen durch Einschieben einer Leerkammer in den Strahlengang. Das durch die Netzhaut fallende Licht wurde von einem Photomultiplier (Typ 9634 QR, EMI) aufgefangen. Da die Netzhaut ein optisch trübes Medium ist, wurde die Photokathode ($\varnothing$ 44 mm) in den kürzest möglichen Abstand (13 mm) von der Netzhaut gebracht, um alles vorwärts gestreute Licht aufzufangen. Die so erzeugten Photoströme durchliefen einen Strom-Spannungs-Wandler, dem ein Digital-Voltmeter mit Drucker und ein Logarithmierkonverter mit Kompensationsschreiber nachgeschaltet waren. Der Schreiber (Servogor, Metrawatt) registrierte in den Versuchen die Extinktion als Funktion der Zeit bei konstanter Wellenlänge.

5. Bleichung

Lichtblitze zur Bleichung wurden mit einer 500-J-Elektronenblitzröhre mit Xenon-Füllung erzeugt. Die Blitzdauer, definiert als Zeit, in der 90 % des Lichtes abgestrahlt werden, betrug 1,5 msec. Das Lampenhaus der Blitzröhre war ausgestattet mit einem Quarzkondensor, einem Wärmeschutzfilter (KG 1 / 5 mm) und zur Absorption der u.v.-Strahlung mit einem Gelbfilter (GG 14). In einigen Versuchen wurde statt des Gelbglasses mit einem Neutralgrauglas aus Quarz (Dichte 0,5) gearbeitet. Der Blitz war in diesem Fall relativ reich an u.v.-Strahlung. Die Belichtung, der die Netzhaut pro Blitz ausgesetzt war, betrug $8,79 \cdot 10^5$ lxs. Bei Kenntnis der Farbtemperatur des Blitzlichtes, der Absorptionseigenschaften und der Konzentration des Rhodopsins in den Rezeptorzellen ließ sich ausrechnen, daß jedes Rhodopsin-Molekül unter diesen Bedingungen etwa 10 Quanten pro Blitz absorbiert. Diese Zahl gilt für u.v.-haltige (weiße) wie u.v.-freie (gelbe) Blitze gleichermaßen (vergl. auch BAUMANN, 1970).

6. Computer-Auswertung

Die gesuchten Geschwindigkeitskonstanten wurden mit Hilfe eines Computers (IBM 1130) bestimmt. Das benutzte Programm (BMDX 85 ; Nonlinear Least Squares ; DIXON, 1970) basiert auf der Methode der kleinsten Quadrate. Um mit ihm arbeiten zu können, müssen die Funktion, deren Parameter zu bestimmen sind, in expliziter Form sowie ihre partiellen Ableitungen nach den Parametern bekannt sein. Weitere Einzelheiten im Ergebnisteil.

III. Ergebnisse

1. Spektren der isolierten Froschnetzhaut vor und nach Bleichung

Kurve A in Abb. 1 zeigt ein Spektrum der isolierten Netzhaut mit dem für Rhodopsin typischen Absorptionsmaximum bei 500 nm. Blitzlichtbestrahlung führte zur Bleichung von ca. 2/3 des Pigmentes (Kurve B). Wurde anschließend die Netzhaut 30 min lang mit Licht der Wellenlänge 500 nm intensiv bestrahlt, dann verschwand auch das durch den Blitz nicht gebleichte Pigment (Kurve C).

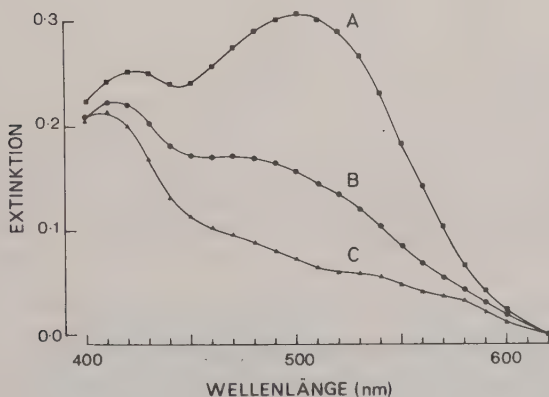


Abb. 1. Extinktionsspektren der isolierten Netzhaut vor (A) und nach (B) einem gelben (u.v.-freien) Blitz (ca. $9 \cdot 10^5$ lxs) sowie nach völliger Bleichung allen photolabilen Materials (C). Kurve B repräsentiert photoregeneriertes Pigment; sie wurde 2 1/2 Stunden nach dem Blitz registriert, da bei der Versuchstemperatur von 10 °C der Zerfall des gebleichten Rhodopsins diese Zeit in Anspruch nahm. Die Extinktionswerte der drei Kurven bei 620 nm wurden gleich 0 gesetzt.

Kurve B repräsentiert nicht originales Rhodopsin, sondern photoregeneriertes Pigment. Dafür sprechen die in Abb. 2 gezeigten Differenzspektren. Subtrahiert man die Werte der Kurve C von denen der Kurve A, erhält man das Differenzspektrum des Rhodopsins ($A - C$). Die Differenz der Werte aus den Kurven B und C ergibt eine sehr ähnliche, aber gegenüber der Kurve $A - C$ in den Bereich kürzerer Wellenlängen verschobene Kurve $B - C$.

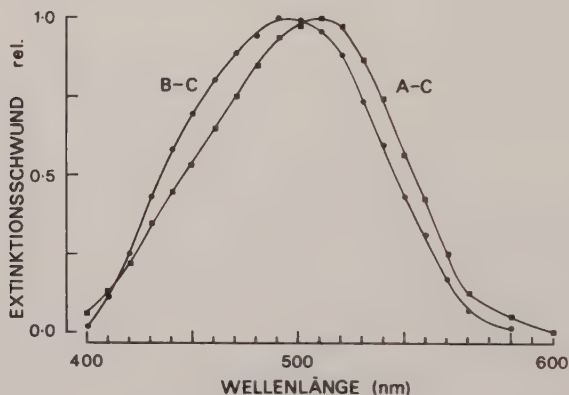


Abb. 2. Aus den Daten der Abb. 1 berechnete Differenzspektren des Rhodopsins ($A - C$) und des photoregenerierten Pigmentes ($B - C$). Der bei der Subtraktion A minus C bzw. B minus C erhaltene Höchstwert wurde gleich 1 gesetzt. Kurve $B - C$ ist gegenüber Kurve $A - C$ um ca. 9 nm in den Bereich kürzerer Wellenlängen verschoben (bei 0,5 rel. Extinktionsschwund, langwelliger Spektralbereich).

Die Verschiebung beträgt bei einem relativen Extinktionsschwund von 0,5 im langwelligen Spektralbereich ($\lambda \sim 550$ nm) ca. 9 nm. Eine solche Verschiebung ist typisch für Photoregeneration, ein Effekt, der bei Mehrfachabsorption auftritt. Durch ein einzelnes Lichtquant wird ein 11-cis-Rhodopsin-Molekül in ein all-trans-Photoprodukt umgewandelt. Zur Bleichung kommt es nur, wenn das all-trans-Photoprodukt nicht seinerseits von einem weiteren Lichtquant getroffen wird. Erfolgt eine zweite Absorption (allgemein: eine geradzahlige Mehrfachabsorption),

Dann wird die prosthetische Gruppe des all-trans-Photoproduktes in eine cis-Konfiguration reisomerisiert. Alle von einer ungeraden Anzahl Quanten getroffenen Rhodopsin-Moleküle werden dagegen gebleicht. Im vorliegenden Falle entstand bei der Photoregeneration durch gelbes (u.v.-freies) Blitzlicht eine Mischung aus 11-cis- und 9-cis-Rhodopsin (Isorhodopsin) (vergl. BAUMANN, 1970). Nach BRIDGES (1961) gibt die Wellenlängenverschiebung Auskunft über das Mischungsverhältnis. Es betrug hier etwa 1 : 1.

2. Einfluß der spektralen Zusammensetzung des Blitzlichtes auf die Anfangsbedingungen der langsamen Dunkelreaktionen

In der Mehrzahl der Versuche wurden die ultravioletten und die kurzwelligen sichtbaren Anteile des Blitzlichtes durch ein Gelbglass (GG 14) ausgefiltert (gelber Blitz). Ohne diese Filterung (weißer Blitz) traten Komplikationen auf, die zum Verwerfen zahlreicher Vorversuche zwangen. Die u.v.-Anteile im weißen Blitzlicht haben zwei Wirkungen: 1. sie verstärken die Photoregeneration von Rhodopsin und Isorhodopsin, 2. sie verursachen die photochemische Umwandlung von Meta II ($\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$) in Meta III.

Die Photoregeneration wurde bei niedrigen Temperaturen besonders deutlich. Aus Abb. 1 geht hervor, daß durch einen gelben (u.v.-freien) Blitz bei der Versuchstemperatur von 10 °C 2/3 des Rhodopsins gebleicht und 1/3 der Moleküle photoregeneriert wurden. Bei einer Versuchstemperatur von 30 °C hingegen wurde durch den gleichen Blitz weniger als 1 % des Pigmentes photoregeneriert. Bei weißen (u.v.-haltigen) Blitzen lag die Ausbeute an photoregeneriertem Pigment generell höher. Sie betrug bei 30 °C bereits 10 % und stieg mit fallender Temperatur deutlich an.

Die photochemische Bildung von Meta III durch weißes (u.v.-haltiges) Blitzlicht soll anhand der Originalregistrierungen in Abb. 3 erklärt werden. In heißen Versuchen wurde die Extinktion der ungebleichten Netzhaut bei 400 nm und 30 °C etwa 5 min lang registriert. Dann wurde

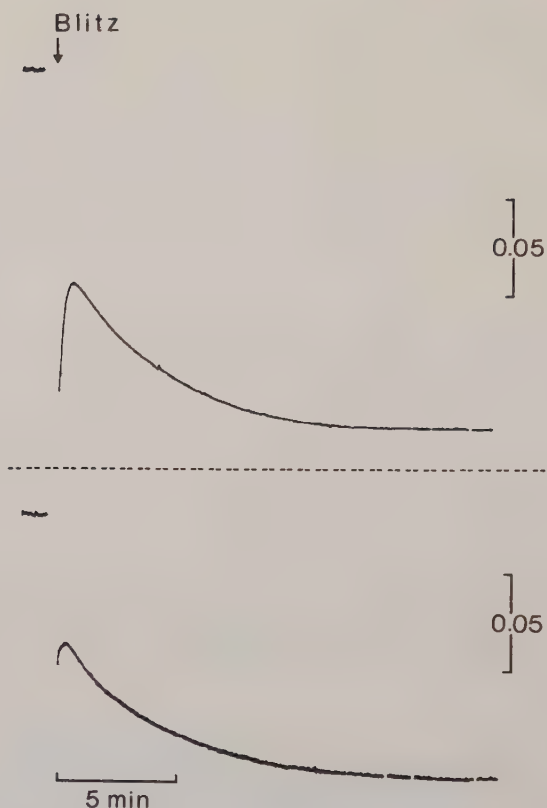


Abb. 3. Zeitverlauf der Extinktionsänderungen in der isolierten Froschnetzhaut bei 400 nm nach einem gelben (u.v.-freien) Blitz (oben) und nach einem weißen (u.v.-reichen) Blitz (unten). Temperatur: 30 °C. Das nach der Photolyse entstehende Photoprodukt (Metarhodopsin III) erreichte seine Maximalkonzentration im Fall des gelben Blitzes nach 35 sec (oben); bei weißem Blitzlicht lag es sofort nach der Belichtung in höherer Konzentration vor und erreichte seine Maximalkonzentration bereits nach 20 sec.

die Netzhaut im Fall des oben dargestellten Versuches mit einem gelben (u.v.-freien) Blitz, im Fall des unten dargestellten Versuches mit einem weißen (u.v.-haltigen) Blitz belichtet. Die anschließend ablaufenden Extinktionsänderungen wurden bei streng konstanter Temperatur während ca. 25 min registriert. Meta III ist das einzige langsam zerfallende Photoprodukt, das Licht der Wellenlänge 480 nm absorbieren kann. Die in der Abb. 3 registrierte Extinktion ist somit der Konzentration des Meta III direkt proportional.

Die Konzentration des Meta III war in dem Versuch mit weißem (u.v.-haltigem) Blitzlicht unmittelbar nach dem Blitz ($t = 0$) deutlich von 0 verschieden, wenn mit 0 die Extinktion am Versuchsende bezeichnet wird. Das zur Zeit $t = 0$ bereits vorliegende Meta III entstand nach WILLIAMS (1960) photochemisch aus Meta II durch Absorption von u.v.-Strahlung. Auch in dem in Abb. 3 oben gezeigten Versuch mit gelbem (u.v.-freiem) Blitz war die Konzentration des Meta III bei Registrierbeginn nicht genau gleich 0, sie startete aber praktisch von dem Wert, der am Versuchsende (nach ca. 30 min Dunkelheit) erreicht wurde. Geringe Abweichungen von diesem theoretischen Nullwert traten auf, da die Registrierung erst 1 bis 2 sec nach dem Blitz begann, weil der Schreiber eine Einstellzeit von $\approx 1,5$ sec aufweist.

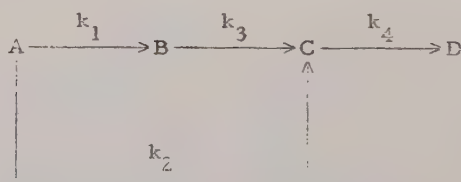
Ist die Konzentration des Meta III (wie die des Retinals und des Retinols) am Anfang der Dunkelreaktionen, wie im Fall der weißen (u.v.-freien) Blitze, von 0 verschieden, erfordert dies ein komplizierteres Modell als es für die Anfangsbedingung (Konzentration des Meta III gleich 0) nach gelben (u.v.-freien) Blitzen gilt. Geringe Unsicherheiten in der Bestimmung der Anfangskonzentrationen wirken sich darüber hinaus stark auf die zu berechnenden Geschwindigkeitskonstanten aus. Nach einigen Versuchen mit weißem (u.v.-haltigem) Blitzlicht, deren quantitative Aufarbeitung sich als sehr schwierig erwies, wurde später, d.h. in den nachfolgend beschriebenen Versuchen ausschließlich mit gelbem Blitzlicht ohne u.v.-Strahlung gearbeitet.

3. Die Kinetik der langsamen Dunkelreaktionen

Die Kinetik der langsamen Dunkelreaktionen wird nachfolgend mit Hilfe eines Modells beschrieben, dem vier Photoprodukte und vier Geschwindigkeitskonstanten zugrunde liegen (BAUMANN, 1972). Beteiligt sind Meta II, Meta III, Retinal und Retinol, für die jetzt die Kurzbezeichnungen A, B, C und D eingeführt werden sollen. Die Photoprodukte entstehen in der gleichen zeitlichen Reihenfolge, in der sie hier aufgeführt werden. Die langsamen Dunkelreaktionen laufen aber nicht als Folgereaktionen



ab, sondern es existieren zwei parallele Zerfallswege für A. Neben dem Weg von A über B zu C gibt es auch einen direkten Weg von A zu C. Das Reaktionsschema läßt sich wie folgt formulieren :



Mit k_1 , k_2 , k_3 und k_4 seien die Geschwindigkeitskonstanten bezeichnet. In dem Schema nicht aufgeführt sind das Wasser, das als im Überschuß vorhanden angenommen wird, das Opsin, das bei der hydrolytischen Abspaltung des Chromophors entsteht, und das am letzten Schritt beteiligte Enzym.

Behandelt man alle vier Schritte als Reaktionen erster Ordnung, läßt sich die Kinetik des Modells durch folgende Differentialgleichungen beschreiben :

$$\frac{dA}{dt} = - (k_1 + k_2) A$$

$$\frac{dB}{dt} = k_1 A - k_3 B$$

(1)

$$\frac{dC}{dt} = k_2 A + k_3 B - k_4 C$$

$$\frac{dD}{dt} = k_4 C$$

Die Anfangsbedingungen (s. auch vorhergehenden Abschnitt) ergeben sich aus den folgenden Überlegungen : Die Reaktionen von der Photoisomerisation des Rhodopsins bis zur Bildung des Meta II verlaufen um Größenordnungen schneller als die Zerfallsreaktionen des Meta II. Es kann daher angenommen werden, daß unmittelbar nach dem Blitz nur Meta II vorliegt, das dann langsam zerfällt. Der bleibende Extinktionsverlust bei 500 nm (Abb. 1) muß dem Zerfall von Rhodopsin, der plötzliche Extinktionsanstieg bei 380 nm unmittelbar nach dem Blitz (Abb. 7, gleicher Versuch wie Abb. 1) der Bildung von Meta II zugeschrieben werden. Berücksichtigt man, daß die Extinktionskoeffizienten des Rhodopsins und des Meta II gleich sind (MATTHEWS et al., 1963), so entsprechen sich in der Tat unmittelbar nach dem Blitz Rhodopsin-Zerfall und Meta II-Bildung. Das gesamte der Bleichung unterworfenene Pigment liegt also zu diesem Zeitpunkt als Meta II vor.

D.h. zur Zeit $t = 0$ ist $A = A_0$; $B = C = D = 0$. Setzt man $A_0 = 1$, so erhält man als Lösung der Gleichungen (1) :

$$A = e^{-(k_1 + k_2) t} \quad (2)$$

$$B = \frac{k_1}{k_3 - (k_1 + k_2)} (e^{-(k_1 + k_2) t} - e^{-k_3 t}) \quad (3)$$

$$C = \frac{k_1 k_3 + k_2 (k_3 - k_1 - k_2)}{(k_3 - k_1 - k_2) (k_4 - k_1 - k_2)} e^{-(k_1 + k_2) t} \\ + \frac{k_1 k_3}{(k_1 + k_2 - k_3) (k_4 - k_3)} e^{-k_3 t} \\ + \frac{k_1 k_3 + k_2 (k_3 - k_4)}{(k_1 + k_2 - k_4) (k_3 - k_4)} e^{-k_4 t} \quad (4)$$

$$D = 1 - (A + B + C) \quad (5)$$

In den Gleichungen (2) bis (5) sind die Konzentrationen A , B , C und D Funktionen der Zeit und der Geschwindigkeitskonstanten k_1 bis k_4 .

Abb. 4 zeigt diese vier Funktionen in graphischer Darstellung ;
das Beispiel beruht auf Zahlenwerten, die bei 20 °C gelten.

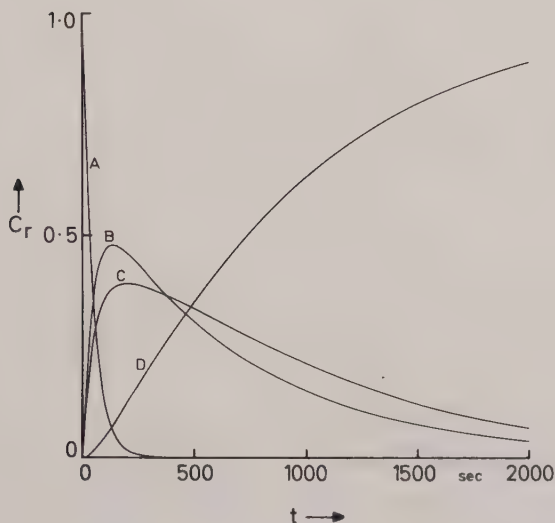


Abb. 4 . Relative Konzentration der an den langsamen Dunkelreaktionen beteiligten Stoffe Metarhodopsin II (A), Metarhodopsin III (B), Retinal (C) und Retinol (D) als Funktion der Zeit bei 20 °C Versuchstemperatur. Die Kurven repräsentieren die Gleichungen (2) bis (5).

a. Bestimmung von k_1 , k_2 und k_3

Nach Gleichung (3) ist B, die Konzentration des Meta III, eine Funktion der Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 , k_3 und der Zeit t :

$$B = f(k_1, k_2, k_3, t).$$

Wie auf Seite 12 bereits dargelegt, ist B der Extinktion bei 400 nm proportional. Um k_1 , k_2 und k_3 zu bestimmen, wurde daher die Extinktion bei dieser Wellenlänge nach einem gelben (u.v.-freien) Blitz bei konstanter Temperatur als Funktion der Zeit registriert. Versuche wurden bei 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C durchgeführt.

Vor einer Auswertung der Kurven wurden die Daten auf die Konzentration der Substanz A zum Zeitpunkt 0 normiert ($A_0 = 1$); dabei war der gegenüber Meta II um etwa 10 % niedrigere Extinktionskoeffizient des Meta III (B) zu berücksichtigen. Anhand der den einzelnen Versuchen entnommenen Wertepaare B, t wurden mit dem Computer nach der Methode der kleinsten Quadrate die Parameter der Gleichung (3) k_1 , k_2 und k_3 berechnet. Dazu wurden dem Computer Schätzwerte für die Geschwindigkeitskonstanten in der richtigen Größenordnung vorgelegt. Der Computer variierte nun in einem Iterationsverfahren die vorgelegten Werte so, daß die Summe der Fehlerquadrate minimal wurde (benutztes Programm: BMDX 85; DIXON, 1970).

In der folgenden Tabelle 1 sind die im untersuchten Temperaturbereich bestimmten Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 und k_3 (Einheit: sec^{-1}) aufgeführt.

<u>Tabelle 1</u>	Temp.	k_1	k_2	k_3
	10 °C	$5,55 \cdot 10^{-3}$	$9,71 \cdot 10^{-4}$	$4,71 \cdot 10^{-4}$
	15 °C	$8,47 \cdot 10^{-3}$	$3,30 \cdot 10^{-3}$	$8,25 \cdot 10^{-4}$
	20 °C	$1,31 \cdot 10^{-2}$	$6,69 \cdot 10^{-3}$	$1,45 \cdot 10^{-3}$
	25 °C	$2,88 \cdot 10^{-2}$	$2,39 \cdot 10^{-2}$	$2,47 \cdot 10^{-3}$
	30 °C	$4,35 \cdot 10^{-2}$	$4,37 \cdot 10^{-2}$	$4,50 \cdot 10^{-3}$

Die Daten beruhen auf je einem Versuch. Vier weitere wurden wegen technischer Mängel nicht ausgewertet. Bei 25 °C lagen zwei qualitativ gleichwertige Versuche vor. Die Auswertung wurde auf das Präparat beschränkt, das mehr Rhodopsin enthielt.

Der Grad der Übereinstimmung der Versuchsergebnisse mit der Voraussage nach dem Modell ergibt sich aus Abb. 5. Hier ist die Gleichung (3) mit Hilfe der für 10 °C, 20 °C und 30 °C bestimmten Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 und k_3 graphisch dargestellt. Dazu sind die Ergebnisse der entsprechenden Versuche bei 10 °C (■), 20 °C (●) und 30 °C (▲) eingezeichnet. Die Übereinstimmung zwischen Einzeldaten und Kurve ist fast ideal bei 30 °C; sie liegt noch innerhalb der Meßunsicherheit ($\pm 0,002$ Extinktionseinheiten) bei 20 °C. Im unteren Temperaturbereich treten geringe systematische Abweichungen auf. Der Prozeß, der diese verursacht, wird in der Diskussion erläutert.

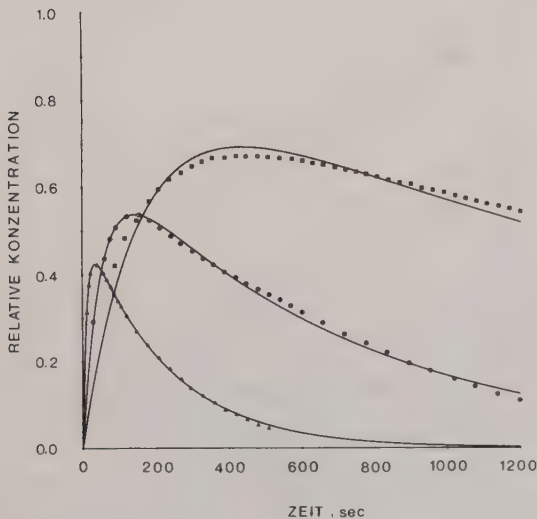


Abb. 5. Vergleich der bei 480 nm und 30 °C (▲), 20 °C (●) sowie 10 °C (■) gemessenen Extinktionen mit den Voraussagen nach Gleichung (3) des reaktionskinetischen Modells (Kurven). Alle Einzeldaten und Kurven wurden von dem für die Rechnungen zur Verfügung stehenden Computer gezeichnet.

Die Tabelle 1 zeigt eine starke Temperaturabhängigkeit der Konstanten. Der Temperaturkoeffizient Q_{10} beträgt für k_1 und k_3 etwa 3; im Fall von k_2 wird sogar ein Wert von annähernd 7 erreicht.

Mehr Einzelheiten des Temperatureinflusses zeigt Abb. 6, in welcher die Logarithmen der Konstanten als Funktion des Kehrwertes der absoluten Temperatur (Arrhenius-Darstellung) aufgetragen sind. Die Geraden sind als Regressionsgeraden aus den entsprechenden Daten berechnet.

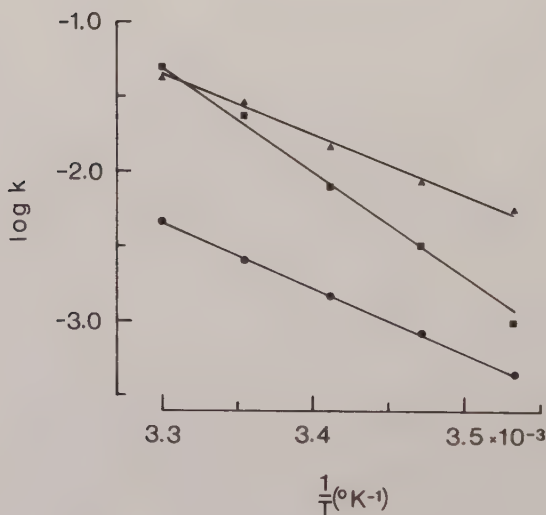


Abb. 6. Arrhenius-Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten k_1 (▲), k_2 (■) und k_3 (●) im Bereich von 10 °C ($3,55 \cdot 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1}$) bis 30 °C ($3,30 \cdot 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1}$). Die Aktivierungsenergien entsprechen den Steigungen der Geraden (lineare Regression).

b. Bestimmung von k_4

Zur Extinktion bei 380 nm tragen die Photoprodukte Meta II, Meta III, Retinal und Retinol in der Relation 1 : 0,25 : 1 : 0,02 bei. Die Relation ergibt sich aus den bekannten Extinktionskoeffizienten der Substanzen bei dieser Wellenlänge.

Wird wiederum auf A_0 normiert, so ergibt sich die folgende Gleichung :

$$E = A + 0,25B + C + 0,02D \quad (6),$$

worin A, B, C und D durch die Gleichungen (2) bis (5) gegeben sind. Gleichung (6) beschreibt die Extinktionsänderung bei 380 nm nach Applikation eines Blitzes. Abb.7 zeigt diesen Prozeß als Originalregistrierung bei 10 °C.

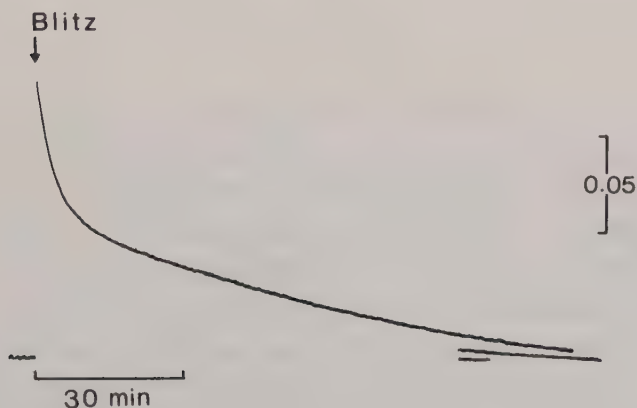


Abb.7. Originalregistrierung der Extinktionsänderungen bei 380 nm und 10 °C. Die Kurventeile (rechts unten) sind längs der Zeitachse aneinandergesetzt zu denken.

Die Kurventeile (rechts unten) sind längs der Zeitachse zueinander-gesetzt zu denken. Die Aufteilung wurde wegen der langen Versuchsdauer bei 10 °C notwendig. Der nach dem Blitz erfolgende plötzliche Anstieg der Extinktion entspricht der Bildung des Meta II ($\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$). Der relativ steile Abfall der Extinktion am Anfang der Kurve zeigt den Zerfall des Meta II an. Sobald A, die relative Konzentration des Meta II, sehr klein ($\approx 0,001$) wird, tragen nur noch Meta III, Retinal und Retinol zur Extinktion bei 380 nm bei. Dieser Zeitpunkt läßt sich für jede Versuchstemperatur mit Hilfe der zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 nach

$$A = 0,001 = e^{-(k_1 + k_2) t} \quad (2)$$

$$t = -\ln 0,001 / (k_1 + k_2)$$

berechnen. Gleichung (6) vereinfacht sich so zum folgenden Ausdruck :

$$E' = 0,25B + C + 0,02D \quad (7);$$

er liegt der Versuchsauswertung zugrunde. E' ist eine Funktion der Konstanten k_1 bis k_4 sowie der unabhängigen Variablen t . k_1 bis k_3 sind bereits bekannt (s. Tabelle 1). Die einzig unbekannte Größe der Gleichung (7) ist die Geschwindigkeitskonstante k_4 . Durch partielle Ableitung von C und D nach k_4 läßt sich diese Konstante mit Hilfe des Computers berechnen (Methode der kleinsten Quadrate).

Tabelle 2 enthält die für die Geschwindigkeitskonstante k_4 im untersuchten Temperaturbereich gefundenen Werte (Einheit : sec^{-1}). Angegeben sind die Mittelwerte aus der jeweiligen Zahl der Versuche (N) und die mittleren Fehler der Mittelwerte ($\pm$). Der Wert für $21 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ist einer früheren Arbeit am gleichen Objekt (BAUMANN, 1972) entnommen.

Tabelle 2

Temp.	$k_4 \cdot 10^3$	$\pm$	N
10 °C	0,956	—	2
21 °C	2,52	0,26	6
30 °C	5,63	0,17	6

Die beiden Einzelwerte bei 10 °C betragen 0,908 und 1,004 ($\cdot 10^{-7} \text{sec}^{-1}$).

Abb. 7 zeigt die Arrhenius-Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten k_4 .

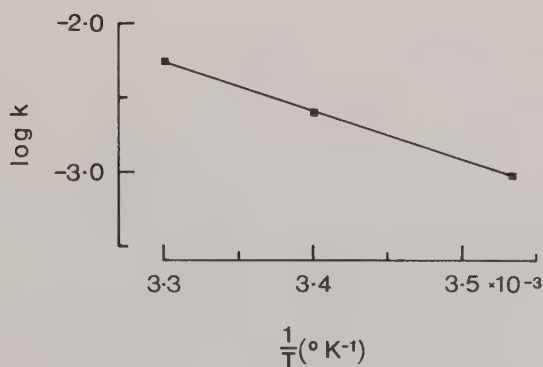


Abb. 8. Arrhenius-Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten k_4 . Eingetragen sind die Logarithmen der Mittelwerte aus Tabelle 2. Die Steigung der Geraden entspricht einer Aktivierungsenergie von 15 kcal/mol.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse des in Abb. 7 gezeigten Versuches mit der Voraussage nach dem Modell wird in Abb. 9 demonstriert. Die durchgezogene Kurve ist die graphische Darstellung der Gleichung (7). Die Quadrate bezeichnen die Meßwerte. Eine ähnlich gute Übereinstimmung wurde auch bei den übrigen Versuchen bei dieser und bei den anderen Temperaturen gefunden.

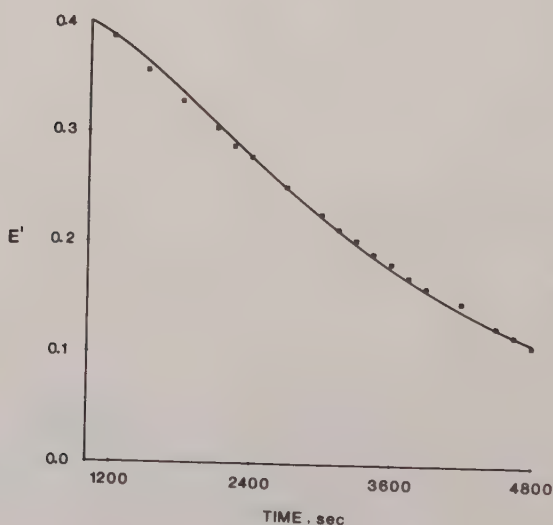


Abb. 9 . Vergleich zwischen den Daten des in Abb. 7 gezeigten Versuches bei 380 nm und 10 °C (■) mit der Voraussage nach Gleichung (7) des Modells (Kurve). Daten und Kurve wurden wie in Abb. 5 vom Computer gezeichnet.

IV. Diskussion

1. Untersuchter Temperaturbereich

Die obere Grenze des untersuchten Temperaturbereiches war dadurch gegeben, daß bei mehr als 30°C der thermische Zerfall des Rhodopsins der Species Rana lessonae beginnt (LYTHGEE and WILLIAM, 1930). In Vorversuchen, in denen mit Temperaturen über 30°C gearbeitet wurde, konnten über einen Zeitpunkt hinaus, zu dem der durch Licht eingeleitete Rhodopsin-Zerfall abgeschlossen sein sollte, noch Extinktionsänderungen festgestellt werden. Sie lassen sich auf den thermischen Zerfall des Pigmentes zurückführen.

Bei 10°C , der niedrigsten Temperatur dieser Untersuchungen, dauerte ein Versuch bis zu $2\frac{1}{2}$ Stunden. Es war nicht möglich, die Temperatur in den Grenzen von $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ über eine noch längere Zeit bei noch tieferen Temperaturen konstant zu halten. Auch mehrten sich mit der Länge der Versuchsdauer weitere technische Schwierigkeiten, wie z.B. Luftblasen im Perfusionssystem. Daher wurden 10°C als untere Grenze gewählt.

2. Gültigkeit des reaktionskinetischen Modells

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Modell (die Gleichungen (2) bis (5)) ist auf der Grundlage von Messungen bei 21°C entwickelt worden. Eine Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es, die Gültigkeit des Modells in einem weiteren Temperaturbereich zu prüfen. Abb. 5 zeigt, daß auch bei 10°C und bei 30°C das Modell gut zur Beschreibung der experimentellen Befunde geeignet ist; denn die auf der Grundlage des Modells berechneten Kurven (Abb. 5) folgen den aus den Meßwerten abgeleiteten Einzeldaten (Quadrat, Punkte und Dreiecke in Abb. 5). Bei 30°C ist die Übereinstimmung fast ideal. Bei 20°C treten geringe Abweichungen auf, die durch die Meßunsicherheit des Verfahrens bedingt sind. Die einzige systematische Abweichung findet sich bei 10°C ; dort sind die Meßwerte anfangs größer als die Theorie voraussagt. Die Ursache zeigt sich in einem Befund, der auch bei 15°C beobachtbar ist (s. Abb. 10).

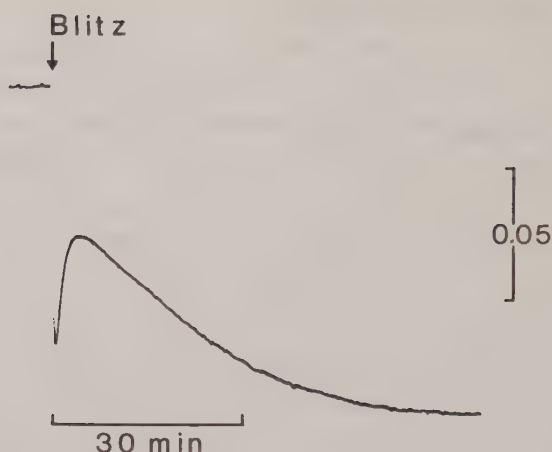


Abb. 10. Originalregistrierung der Extinktionsänderungen bei 480 nm und 15 °C. Dem Extinktionsanstieg durch die Bildung des Metarhodopsins III geht kurzzeitig ein Extinktionsabfall (kleiner abfallender Kurventeil nach dem Blitz) voraus, der wahrscheinlich durch den schnellen Zerfall eines bei 480 nm absorbierenden Photoproduktes verursacht wird.

In der vorstehenden Abbildung einer Originalregistrierung bei 480 nm und 15 °C ist im Gegensatz zu der Originalregistrierung in der Abb. 3 (oben; 480 nm und 30 °C) vor dem Anstieg der Extinktion (nach dem Blitz) ein kurzer abfallender Kurventeil zu erkennen, der offenbar den Zerfall eines bei 480 nm absorbierenden Photoproduktes anzeigt. Der Abbau dieses Photoproduktes geht anscheinend der Bildung des Meta III voraus. Es muß deshalb diskutiert werden, ob es sich dabei um den Zerfall von Meta I ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$) handelt, der zur schnellen Bildung von Meta II ($\lambda_{\text{max}} = 300 \text{ nm}$) führt. Eine entsprechende Beobachtung bei 300 nm konnte aber auch bei niedrigen Temperaturen (10 °C) nicht gemacht werden. Es wäre ein dem Blitz unmittelbar folgender Extinktionsanstieg

gemäß der Bildung des Meta II aus Meta I zu erwarten gewesen. Der Befund läßt sich daher auf der Grundlage des hier vorliegenden Materials nicht erklären. Seine störende Wirkung dauert längstens 30 bis 60 sec; danach lassen sich die Meßwerte auch bei niedrigen Temperaturen hinreichend gut durch Gleichung (3) beschreiben. Dies wird indirekt durch die Arrhenius-Darstellung der Abb. 6 bestätigt. Die Logarithmen der für 10 °C und 15 °C bestimmten Konstanten liegen auf den Regressionsgeraden oder zeigen keine größeren Abweichungen als die bei höheren Temperaturen bestimmten Werte.

Eine weitere Bestätigung der Gültigkeit des Modells auch bei den tieferen Temperaturen geht aus Abb. 9 hervor, in der die bei 380 nm und 10 °C gemessenen Extinktionen mit der Voraussage nach Gleichung (7) des Modells verglichen werden. Gleichung (7) ist mit Hilfe der für 10 °C bestimmten Konstanten graphisch dargestellt. Dabei ist zu betonen, daß zur optimalen Anpassung der Kurve an die Daten nur die Konstante k_4 variiert wurde. E' in Gleichung (7) ist aber auch abhängig von k_1 , k_2 und k_3 , die unabhängig von k_4 schon bestimmt worden waren. Die gute Vereinbarkeit von k_4 mit den anderen Konstanten ist eine wesentliche Stütze des benutzten Modells. Auch in Abb. 9 gibt es jedoch einige Abweichungen zwischen den Daten und der Kurve. Sie liegen um $t = 1200$ sec. Die graphische Darstellung der Gleichung (7) zeigt hier eine kleine nach oben gerichtete Konvexität. Sie ist dadurch bedingt, daß das Retinal bei 10 °C zu dieser Zeit seine maximale Konzentration erreicht (Gleichung (4)). In dem gezeigten Versuch (Abb. 7) kann diese Konvexität aber nicht beobachtet werden. Daraus läßt sich schließen, daß der Extinktionskoeffizient von Retinal niedriger ist als in den Gleichungen (6) und (7) angenommen wird. (Die Gleichungen gelten in dieser Form nur, wenn die Extinktionskoeffizienten von Meta II und Retinal gleich sind.) Nimmt man für Retinal einen 7 % kleineren Extinktionskoeffizienten an als für Meta II (MATTHEWS et al., 1963), so lautet Gleichung (7) :

$$E' = 0,25B + 0,93C + 0,02D \quad (7a).$$

Nach Gleichung (7a) ergab sich dann bei der Versuchsauswertung mit Hilfe des Computers eine genauere Übereinstimmung um $t = 1200 \text{ sec}$; der Wert der Konstante k_4 änderte sich aber nur unwesentlich, so daß auf weitere Korrekturen (Variation des Koeffizienten vor C) verzichtet wurde.

3. Einfluß der Temperatur auf die Geschwindigkeitskonstanten

k_1 , k_2 und k_3

Die Arrhenius-Darstellung (Abb. 6) zeigt den Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten ($\log k$) und dem Kehrwert der absoluten Temperatur ($1/T$). Die Abhängigkeit des $\log k$ von $1/T$ ist für die drei Reaktionen über den gesamten Temperaturbereich von 10°C bis 30°C gleichbleibend linear. Die Steigung der Geraden ist gleich $-E_a/2,303R$, wobei E_a die Aktivierungsenergie und R die Gaskonstante ist.

Die Geraden für die Umwandlung von Meta II in Meta III (k_1) und den Meta III-Zerfall (k_3) laufen annähernd parallel. Wesentlich steiler, auch als die Gerade für die Reduktion des Retinals, verläuft die Gerade für die Meta II-Hydrolyse (k_2). Aus der Arrhenius-Darstellung geht somit eine deutlich verschiedene Temperaturabhängigkeit der beiden Zerfallswege des Meta II hervor, wobei die Meta II-Hydrolyse in stärkerem Maße temperaturabhängig ist.

Die Aktivierungsenergien aus k_1 , k_2 und k_3 sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Tabelle enthält darüber hinaus Werte für $\Delta F^\ddagger$, die freie Enthalpie der Aktivierung, für $\Delta H^\ddagger$, die Aktivierungsenthalpie, und für $\Delta S^\ddagger$, die Aktivierungsentropie. Diese Werte wurden nach den folgenden Formeln berechnet:

$$\Delta F^\ddagger = -RT \ln \frac{k_h}{k_B T}$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT$$

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta F^\ddagger}{T}$$

wobei h das Planck'sche Wirkungsquantum und k_B die Boltzmann-Konstante ist. $\Delta F^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$ und $\Delta S^\ddagger$ sind Parameter der Eyring'schen Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeit. Diese Theorie ist vielfach auf Konformationsänderungen von Proteinen angewandt worden (LUMRY und EYRING, 1954; JCLY, 1965; TANFORD, 1968 und 1970). Da das Chromoprotein Rhodopsin bei der Bleichung Konformationsänderungen durchmacht (HUBBARD, BOWNDS und YOSHIKAWA, 1965; ABRAHAMSON und CESTRY, 1967), erscheint die Anwendung auf das vorliegende Problem gerechtfertigt.

Die interessanteste Größe ist $\Delta S^\ddagger$, die Aktivierungsentropie, die unmittelbar Aufschluß über Konformationsänderungen geben kann. Der thermodynamische Parameter ΔS gilt als echtes Maß für Konformationsänderungen. Bei der Transkonformation von Proteinen geht $\Delta S^\ddagger$ nach einer Vielzahl von Untersuchungen (JCLY, 1965) den Änderungen der Entropie ΔS parallel. Dabei ist nach BRAY und WHITE (1957) $\Delta S^\ddagger$ in erster Näherung etwa halb so groß wie ΔS . In jedem Fall kann die Aktivierungsentropie $\Delta S^\ddagger$ Aufschluß über die Größenordnung der Konformationsänderung geben.

Tabelle 3	Reaktion	E_a			
		$\Delta F^\ddagger$	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta S^\ddagger$	
	Meta II $\rightarrow$ Meta III	18,2	19,6	17,6	- 7
	Meta II-Hydrolyse	32,8	20,1	32,2	+ 41
	Meta III-Zerfall	19,1	20,9	18,5	- 8

Die Einheiten sind für E_a , $\Delta F^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$ kcal/mol und für $\Delta S^\ddagger$ cal/mol $\cdot$ $^\circ K$.

Nach den Werten der vorstehenden Tabelle sind der Übergang von Meta II in Meta III ($\Delta S^\ddagger = - 7$ cal/mol $\cdot$ $^\circ K$) und der Zerfall von Meta III ($\Delta S^\ddagger = - 8$ cal/mol $\cdot$ $^\circ K$) nur von sehr geringen Konformationsänderungen begleitet. Die Hydrolyse des Meta II ($\Delta S^\ddagger = +41$ cal/mol $\cdot$ $^\circ K$) setzt dagegen eine deutliche Konformationsänderung, wahrscheinlich eine Entfaltung des Moleküls, voraus. Die Aktivierungsenergie E_a der

Hydrolyse ist mit 32,8 kcal/mol ungewöhnlich hoch. Die große positive Aktivierungsentropie ($\Delta S^\ddagger = 41 \text{ cal/mol} \cdot ^\circ\text{K}$) muß als der treibende Faktor dieser Reaktion angesehen werden, der den Reaktionsablauf trotz der hohen Barriere von 32,8 kcal/mol ermöglicht.

Die hier an intakten Photorezeptoren gewonnenen Ergebnisse führten zu anderen $\Delta S^\ddagger$ -Werten als von anderen Autoren für die gleichen Reaktionsschritte am extrahierten Pigment gewonnen wurden. Tabelle 4 zeigt, daß für die Aktivierungsentropien $\Delta S^\ddagger$ die entsprechenden Zahlenwerte (Einheit: $\text{cal/mol} \cdot ^\circ\text{K}$) stark differieren.

Tabelle 4

Reaktion	$\Delta S^\ddagger$ - Retina	$\Delta S^\ddagger$ - Lösung	Literatur
Meta II $\rightarrow$ Meta III	- 7	- 50	CSTROY et al. 1966
Meta II-Hydrolyse	+ 41	- 7	HUBBARD et al. 1965
Meta III-Zerfall	- 8	+ 48	CSTROY et al. 1966

EBREY (1966) hat die Umwandlung von Meta II in Meta III am isolierten Rattenauge untersucht; sein Wert von $\Delta S^\ddagger = -10 \text{ cal/mol} \cdot ^\circ\text{K}$ stimmt mit dem hier angegebenen (- 7 $\text{cal/mol} \cdot ^\circ\text{K}$) gut überein.

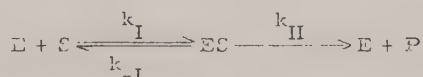
Da $\Delta S^\ddagger$ der Zustandsvariablen ΔS parallel geht, kann gefordert werden, daß die sich dem Meta III-Zerfall anschließende Reaktion mit einer großen positiven Aktivierungsentropie $\Delta S^\ddagger$ einhergeht. Die Summe der $\Delta S^\ddagger$ für den Weg über Meta III sollte annähernd gleich dem $\Delta S^\ddagger$ der Meta II-Hydrolyse sein. Bei der dem Meta III-Zerfall folgenden Reaktion handelt es sich wahrscheinlich um die Hydrolyse von N-Retinyliden-Opsin in Retinal und Opsin, eine bei neutralem pH äußerst schnelle Reaktion (ABRAHAMSON und CSTROY, 1967), die in der Netzhaut noch nicht näher untersucht wurde.

4. Die Geschwindigkeitskonstante k_A

Die Reduktion des Retinals zum Retinol wird von einem in den Außengliedern lokalisierten Enzym (WALD und HUBBARD, 1949) gesteuert.

In der Arrhenius-Darstellung (Abb. 8) ist die Temperaturabhängigkeit der Reaktion gezeigt. Es besteht unter in-vivo-Bedingungen für das Enzym eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten ($\log k$) vom Kehrwert der absoluten Temperatur ($1/T$) nach dem Arrhenius' schen Gesetz wie bei einer einfachen chemischen Reaktion. Das Enzym arbeitet in dem Bereich von 10°C bis 30°C unterhalb seines Temperatureptimums, seine thermische Inaktivierung ist hier nicht von Gewicht.

Eine enzymatische Reaktion verläuft nicht in einem Schritt, sondern besteht aus der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) aus Enzym (E) und Substrat (S) sowie der Rückreaktion und dem Zerfall des Komplexes in Enzym (E) und Produkt (P) :



Mit k_I , k_{-I} und k_{II} seien die Geschwindigkeitskonstanten bezeichnet.

Die hier bestimmte Konstante k_A beschreibt die Gesamtreaktion. Bei hohen Substratkonzentrationen entspräche k_A dem Ausdruck $k_{II}(E_0)$, wobei (E_0) die totale Enzyrkonzentration ist, und die Reduktion des Retinals verlief als Reaktion nullter Ordnung. Die experimentellen Befunde wurden mit Hilfe dieser Hypothese analysiert; es ergab sich jedoch keine befriedigende Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment.

Wird die Reduktion des Retinals hingegen als Reaktion erster Ordnung behandelt (vergl. die Gleichung (1), (4) und (5), ergeben sich durchaus plausible Befunde (vergl. Abb. 9). k_A entspricht dann $k_I k_{II} / (k_{-I} + k_{II})$. Diese Konstante gehorcht in den vorliegenden Versuchen dem Arrhenius' schen Gesetz (vergl. Abb. 8). Dies kann nach LAIDLER (1958) nur in zwei speziellen Fällen eintreten.

Im ersten Fall ist $k_{II} \gg k_{-I}$ und k_A wird gleich k_I . Die Aktivierungsenergie E_a von 15,1 kcal/mol (Steigung der Geraden in Abb. 8) entspricht dann der Energiebarriere des aktivierten Komplexes $\text{ES}^\ddagger$ bei der

Reaktion $E + S \longrightarrow ES$. Im zweiten Fall ist $k_{-I} \gg k_{II}$ und k_4 ist gleich $k_{II}k_I/k_{-I}$. Die Aktivierungsenergie E_a von 15,1 kcal/mol ist dann die Summe aus der Aktivierungsenergie des Schrittes $ES \longrightarrow E + P$ und dem totalen Energieanstieg bei dem Schritt $E + S \longrightarrow ES$ (vergl. LIDLER, 1952, S.200-201). Eine Entscheidung zugunsten des einen oder des anderen Falles ist hier nicht möglich.

Auch für die Konstante k_4 lassen sich die Parameter $\Delta F^\ddagger$ (= 20,7 kcal/mol), $\Delta H^\ddagger$ (= 19,5 kcal/mol) und $\Delta S^\ddagger$ (= -21 cal/mol $\cdot$ $^\circ$ K) berechnen. Der negative Wert der Aktivierungsentropie kann als Entfaltung des Enzymmoleküls bei der Komplexbildung interpretiert werden; diese Auffassung gilt aber nur, wenn sich ausschließlich die Struktur des Moleküls ändert und Wechselwirkungen des Enzyms mit seiner Umgebung vernachlässigt werden können. Es ist allerdings fraglich, ob diese Annahme im Fall der intakten Photorezeptorzelle gerechtfertigt ist.

V. Zusammenfassung

1. Die Temperaturabhängigkeit der langsamen Reaktionsschritte der Sehpurpurbleichung wurde im Bereich von 10 °C bis 30 °C untersucht. Langsame Reaktionsschritte sind: die Umwandlung von Metarhodopsin II in Metarhodopsin III, die Hydrolyse des Metarhodopsins II, der Zerfall des Metarhodopsins III und die Reduktion des Retinals zum Retinol.

2. Die Untersuchungen wurden an isolierten Netzhäuten mit einer spektralphotometrischen Methode durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch einen energiereichen gelben Lichtblitz von 1,5 msec Dauer angestoßen und anhand von Extinktionsänderungen über Zeiträume bis zu 150 Minuten verfolgt.

3. Aus den experimentellen Daten wurden die Geschwindigkeitskonstanten der beteiligten Reaktionen bestimmt; sie gehorchen in allen Fällen dem Arrhenius' schen Gesetz. Die Aktivierungsenergien betragen für die Umwandlung von Metarhodopsin II in Metarhodopsin III 18,2 kcal/mol, für den Metarhodopsin III-Zerfall 19,1 kcal/mol. Die Aktivierungsenergie der Meta II-Hydrolyse ist mit 32,0 kcal/mol deutlich höher, die der enzymatischen Reduktion des Retinals liegt mit 15,1 kcal/mol in dem für Enzymreaktionen üblichen Bereich.

4. Da die Sehpurpurbleichung als reversible Denaturierung eines Chromoproteins aufgefaßt werden kann, wurden die Aktivierungsentropien auf der Grundlage der Eyring' schen Theorie der absoluten[†] Reaktionsgeschwindigkeit berechnet. Die Aktivierungsentropien $\Delta S^\ddagger$ betragen für die Reaktion Metarhodopsin II $\rightarrow$ Metarhodopsin III -7 cal/mol $\cdot$ °K, für den Metarhodopsin III-Zerfall -6 cal/mol $\cdot$ °K, für die Metarhodopsin II-Hydrolyse +41 cal/mol $\cdot$ °K und für die Reduktion des Retinals -21 cal/mol $\cdot$ °K.

5. Die unter 4. genannten Zahlenwerte führten zu folgender Interpretation: Die Umwandlung von Metarhodopsin II in Metarhodopsin III und der Metarhodopsin III-Zerfall gehen mit nur geringen Konforma-

tionsänderungen des Chromoproteins einher, während die hydrolytische Abspaltung der chromophoren Gruppe (Retinal) von dem Protein Opsin mit einer vergleichsweise einschneidenden Konformationsänderung verbunden ist. Die hohe positive Aktivierungsentropie $\Delta S^\ddagger = +41 \text{ cal/mol} \cdot ^\circ\text{K}$ muß außerdem bei der hohen Energiebarriere von 32,6 kcal/mol als der die Hydrolyse treibende Faktor verstanden werden.

6. Aus den Befunden ließ sich weiterhin schließen, daß die in der Literatur angegebenen Daten für micellkolloidale Rhodopsinlösungen die Reaktionen in der intakten Photorezeptorzelle nicht korrekt beschreiben.

Literatur

- ABRAHAMSON, E.W. and S.E. OSTROY (1967) : The photochemical and macromolecular aspects of vision. In : Progress in Biophysics and Macromolecular Biology 17, 179-215, Pergamon Press, Oxford.
- BALL, S., F.D. COLLINS, P.D. DALVI, R.A. MORTON (1949) : Studies on Vitamin A. 11. Reactions of retinene₁ with amino compounds. Biochem. J. 45, 304-307.
- BAUMANN, Ch. (1970) : Flash photolysis of rhodopsin in the isolated frog retina. Vision Res. 10, 789-798.
- BAUMANN, Ch. (1972) : Kinetics of slow thermal reactions during the bleaching of rhodopsin in the perfused frog retina. J. Physiol. 222, 643-663.
- BOLL, F. (1876) : Zur Anatomie und Physiologie der Retina. Monatsber. Akad. Wiss. Berlin, 783-787.
- BRAY, H.G. and K. WHITE (1957) : The rate of reaction. In : Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry, Chapter 5. J. and A. Churchill, London.
- BRIDGES, C.D.B. (1961) : Studies on the flash photolysis of visual pigments. 2. Production of thermally stable photosensitive pigments in flash-irradiated solutions of frog rhodopsin. Biochem. J. 79, 135-143.
- CALDWELL, P.C. (1968) : Factors governing movement and distribution of inorganic ions in nerve and muscle. Physiol. Rev. 48, 1-64.
- DARTNALL, H.J.A. and J.N. LYTHGOE (1965) : The spectral clustering of visual pigments. Vision Res. 5, 81-100.
- DIXON, W.J. (1970) : Biomedical Computer Programs. II-series Supplement, University of California Press, Berkeley.
- EBREY, Th.G. (1968) : The thermal decay of the intermediates of rhodopsin in situ. Vision Res. 8, 965-982.
- HUBBARD, R., D. BOWDEN and T. YOSHIZAWA (1965) : The chemistry of visual photoreception. In : Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 30, 301-315.

- JOLY, M. (1965) : A physico-chemical approach to the denaturation of protein. Academic Press, London, New York.
- KOSTYUK, P.G., Z.A. SCROKINA and Y.D. KHOLDCOVA (1969) : Measurement of activity of hydrogen, potassium and sodium ions in striated muscle fibers and nerve cells, 322-340 (Chapter 15). In : Glass Microelectrodes, ed. by M. Lavallée, C.F. Schanne, N.C. Hébert. J. Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sidney, Toronto.
- KÜHNE, W. (1878) : Zur Photochemie der Netzhaut. In : Untersuchungen aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg, 1.Bd., 1-14.
- LAIDLER, K.J. (1958) : The chemical kinetics of enzyme action. Oxford at the Clarendon Press.
- LUMRY, R. and H. EYRING (1954) : Conformation changes of proteins. J.Chem.Phys. 50, 110-120.
- LYTHGOE, R.J. and J.P. GUILLIAM (1938) : The thermal decomposition of visual purple. J.Physiol. 93, 24-38.
- MATTHEWS, R.G., R. HUBBARD, P.K. BROWN and G. WALD (1963) : Tautomeric forms of metarhodopsin. J.gen.Physiol. 47, 215-240.
- CSTROY, S.E., F. ERHARDT and E.W. ABRAHAMSON (1966) : Protein configuration changes in the photolysis of rhodopsin. II. The sequence of intermediates in the thermal decay of cattle metarhodopsin in vitro. Biochim. Biophys. Acta 112, 265-277.
- SICKEL, W. (1961) : Stoffwechsel und Funktion der isolierten Netzhaut. Symposium Neurophysiologie und Psychophysik des visuellen Systems, Freiburg 1960, S.80-94. Hrsg. R. Jung und H. Kornhuber. Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- TANFORD, C. (1968) : Protein Denaturation. In : Advan. Protein Chem. 23, 121-217 (Part A), 218-282 (Part B).
- TANFORD, C. (1970) : Protein Denaturation. In : Advan. Protein Chem. 24, 1-95 (Part C).

- ALD, G., R. HUBBARD (1949) : The reduction of retinene₁ to vitamin A₁ in vitro. J.gen.Physiol. 32, 367-389.
- WILLIAMS, Th. F. (1960) : Photolysis of metarhodopsin II : Rates of production of P 470 and rhodopsin. Vision Res. 2, 1457-1466.

Dank

Herrn Professor Dr. med. Ch. Baumann danke ich für die Überlassung des Themas sowie die wertvollen Hinweise bei der Ausarbeitung der Dissertation.

Herrn Dipl.-Math. K. Pehl möchte ich für seine Hilfe bei der Anpassung des Computer-Zeichen-Programms an das vorliegende Problem danken.

Herrn Professor Dr. med. R. Thauer und Herrn Professor Dr. med. E. Dodt danke ich, daß ich am W.G. Kerckhoff-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Bad Nauheim, diese Arbeit anfertigen durfte.

Lebenslauf

Am 24. Oktober 1946 wurde ich, Reinhard Reinheimer, als Sohn des Ingenieurs Wilhelm Reinheimer und seiner Ehefrau Johanna, geborener Böhm, in Nieder-Ramstadt bei Darmstadt geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Nieder-Ramstadt, Ravensburg und Heidelberg und dem Besuch des Bunsen-Gymnasiums, Heidelberg, sowie des Ludwig-Georgs-Gymnasiums, Darmstadt, legte ich am 2. Februar 1966 an der letztgenannten Schule die Reifeprüfung ab. Danach studierte ich an der Justus Liebig-Universität, Gießen, 11 Semester Medizin. Am 13. Januar 1972 schloß ich mein Studium mit dem Staatsexamen ab.

Meine Dissertation fertigte ich vom Oktober 1968 bis zum Juli 1972 am W.G. Kerckhoff-Institut, Bad Nauheim, an, wo ich zuletzt als Medizinalassistent tätig war.

Bad Nauheim, August 1972

Reinhard Reinheimer

Richard Pennington

